努利虫疠霉感染桃蚜过程的扫描电镜观察

李　伟[1,2]，甘雅玲[2]，盛承发[2,*]

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部，山东青岛　266003；
2. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京　100080)

摘要：利用扫描电镜观察了努利虫疠霉 *Pandora nouryi*（Remaudière & Hennebert）Humber 初生分生孢子接种桃蚜 *Myzus persicae*（Sulzer）后孢子萌发、入侵以及菌体突破虫体的整个侵染过程。结果表明：附着于虫体表面的初生分生孢子在 3～5 h 后即有 60%以上的萌发率，萌发的孢子形成芽管或产生球形或棍棒状的附着胞；12 h 后大部分孢子均已萌发，并成功入侵寄主虫体；接种 60 h 后，呈掌状分枝的假根首先从桃蚜胸部的腹面突破虫体长出体外，明显区别于新蚜虫疠霉 *Pandora neoaphidis*（Remaudière & Hennebert）Humber 假根突破虫体的位置；假囊状体不多见，且仅分布于蚜虫身体两侧，这可在一定程度上解释努利虫疠霉产孢对湿度条件要求较高的生物学现象。

关键词：努利虫疠霉；桃蚜；感染过程；接种；扫描电镜

中图分类号：Q968.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)02-0202-05

Invasive processes of *Pandora nouryi* (Remaudière & Hennebert) Humber in green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) observed with scanning electronic microscopy

LI Wei[1,2], GAN Ya-Ling[2], SHENG Cheng-Fa[2,*] (1. Department of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The invasive processes of *Pandora nouryi* (Remaudière & Hennebert) Humber in the host aphid *Myzus persicae* (Sulzer) was observed with scanning electronic microscopy. It was found that the conidia attached to the surface of aphid germinated rapidly. About 60% conidia germinated to germ tube or globose appressorium for invasion within 3 – 5 h after attachment. By 12 h after attachment almost all conidia had germinated and invaded into the host successfully. By 60 h postinoculation the digital rhizoids were the first structures to emerge from the breast region of aphid body, attaching the host to the plant. Few pseudocystidia were found and just distributed at the two sides of aphid body, which may explain why existence of more moisture conditions is necessary for free discharge of conidial sporulation from cadavers killed by *P. nouryi*.

Key words: *Pandora nouryi*; *Myzus persicae*; invasive process; inoculation; scanning electronic microscopy

努利虫疠霉 *Pandora nouryi*（Remaudière & Hennebert）Humber 属于虫霉目虫霉科，是蚜虫的一种专性病原菌（Gustafsson，1965；李增智，2000）。春秋两季，在蔬菜上该菌与新蚜虫疠霉 *Pandora neoaphidis*（Remaudière & Hennebert）Humber 以及其他几种虫霉目真菌可以引发田间桃蚜 *Myzus persicae*（Sulzer）种群的真菌流行病，在一些地块蚜虫的死亡率可高达 80%（王未名等，1988），对控制田间蚜虫种群数量发挥了重要作用。室内实验研究表明该菌对桃蚜有较强的致病力（李雪雁等，2003），同时因该菌容易培养、田间适应能力强等（Li *et al*.，2006）特点，具有较大的开发潜力。众多的研究表明，病原真菌的致病力与其孢子在寄主体壁的萌发形式、侵染方式、真菌在寄主体内的生长方式以及菌体突破虫

基金项目：中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放课题（ChineseIPM0501）
作者简介：李伟，男，1976 年 7 月生，博士，讲师，从事害虫微生物防治和海洋真菌活性代谢物研究，E-mail：liwei01@ouc.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：shengcf@ioz.ac.cn
收稿日期 Received：2006-08-14；接受日期 Accepted：2006-09-21

体后的进一步扩散等一系列病理过程密切相关(Butt *et al*.,1990;冯明光和徐均焕,2002)。然而,目前关于努利虫疠霉的杀蚜机理尚未见报道。另外,由于努利虫疠霉与新蚜虫疠霉的初生分生孢子形态极为相似,仅在大小上有所差别(李增智,2000),且田间感染蚜虫症状差别不大,再加上此两种虫疠霉经常同时出现于同一个蚜虫个体,导致难以准确鉴别区分二者。为此,作者利用扫描电镜技术研究了努利虫疠霉感染寄主桃蚜的过程。

1 材料与方法

1.1 供试菌体和蚜虫

努利虫疠霉菌株于 2002 年分离自泰安蔬菜田感菌的桃蚜尸体上,接种在 SEA 培养基[80%的莎氏培养基,添加 20%鸡蛋黄(Papierok and Hajek,1997)]上,保存于 4℃冰箱中。每隔 2 个月转接 1 次菌。实验前,将努利虫疠霉菌株在桃蚜虫体上连续复壮 3 次,以便恢复其较高的致病力。

桃蚜种群饲养在油菜 *Brassica napus* L.(品种:京油 1 号)植株上,生长的环境温度为 20℃,相对湿度 70%~80%,光周期 12L∶12D。选 8~10 日龄的成蚜供试。

1.2 接种平板制备与 SEM 观察

将在 SEA 培养基上生长的努利虫疠霉菌株接种到 SDY 培养液中摇动培养 10 天,获得的粘稠菌丝平铺于水琼脂培养平板上,灭菌滤纸吸干水分,20℃光照培养箱中培养,待产孢高峰出现时,用作接种平板,倒扣在载有雌成蚜的叶片上。“孢子浴”接种(冯明光和徐均焕,2002)2 h,期间转动培养平板,以保证接种均匀。然后将接受‘孢子浴’的蚜虫移入 20℃、相对湿度 100%的环境中,并维持 24 h 的 100%相对湿度,以保证附着于虫体表面的孢子正常萌发。

在接种后的 3、6、12、24、48、60 和 72 h,分别取 4~5 头蚜虫放入 4%戊二醛溶液中固定,然后用 PBS(0.2 mol/L 磷酸缓冲液)缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min。2% 锇酸固定 2 h,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min,乙醇梯度脱水。蚜虫经乙酸乙戊酯处理 30 min,临界点干燥,镀金,HITACHI S-2360N(日立公司)电镜观察。

2 结果与分析

2.1 接种后蚜虫的变化

接种后的前 24 h,蚜虫无明显的异常行为,体色也无明显变化。36 h 后蚜虫对外界的刺激反应迟钝,体色稍微呈现微红或浅黄色。48 h 后出现个别蚜虫死亡,体色微红。60 h 后,死亡的蚜虫个体明显增多,死亡症状十分明显,身体肿胀膨大,体色微红或深黄色,但体表无分生孢子梗长出;此时从胸部腹面长出的假根已发育成熟,将蚜虫固定于基物上,因此蚜虫身体腹部微微上举。72 h 后,大量的分生孢子梗穿透虫体长出体外,并弹射孢子,蚜虫尸体呈现深红色。

2.2 孢子的萌发与入侵

附着于虫体上的孢子萌发较为迅速,3~5 h 后,已有 60%以上的孢子萌发,12 h 后几乎全部的孢子均已萌发,并侵入到虫体内,虫体表面很难发现未萌发的孢子。努利虫疠霉的初生分生孢子在桃蚜体壁上的萌发方式有 3 种:乳突两侧凹陷,乳突端伸长形成芽管(图版Ⅰ:1,2);乳突端凹陷,从乳突正对面的一端长出芽管(图版Ⅰ:3~5);从乳突和其正对面的一端各长出一个芽管(图版Ⅰ:7),这种萌发方式较少出现,并且两端的芽管通常仅有一端能成功入侵虫体。孢子入侵蚜虫寄主体壁所采取的方式有:萌发的芽管在寄主体壁上生长,寻找合适的侵入部位,细长的芽管直接穿刺体壁,成功入侵(图版Ⅰ:5,7);孢子萌发形成附着胞,附着胞通常为球形(图版Ⅰ:6)或棍棒状,侵入钉从附着胞上长出后穿刺寄主体壁。

2.3 真菌突破寄主虫体

接种 60 h 后,假根首先从蚜虫胸部的腹面长出体外(图版Ⅰ:8),将虫体牢牢固定在基物上。假根顶端成掌状分枝,直径约为 40~60 μm(图版Ⅰ:9)。分生孢子梗首先从身体相对柔软的胸部背面节间膜处突破寄主体壁(图版Ⅰ:10),伸出体壁的分生孢子梗迅速形成初生分生孢子,并弹射(图版Ⅰ:11~14)。弹射分生孢子后,分生孢子梗上有一明显的凹陷口(图版Ⅰ:12),直径约为 9 μm。72 h 后分生孢子梗密布整个蚜虫体表,多数蚜虫体表呈现剧烈的撕裂状(图版Ⅰ:15)。假囊状体在虫体表面并不多见,且通常出现于虫体两侧,较粗壮,宽度约有 7.8~16.2 μm(图版Ⅰ:13,14)。

3 讨论

Eilenberg 等（1986）在研究了 *Entomophthora muscae*（Cohn）Fresenius、*Entomophthora planchoniana* Cornu 和 *Entomophthora culicis*（Braun）Fresenius 等 3 种虫霉的初生分生孢子超微结构后认为，存在于初生分生孢子外壁中的粘液参与了孢子对基物的粘附过程。我们的观察也证实了这一观点。努利虫疠霉孢子具有多种萌发方式，但绝大多数的孢子萌发部位仅出现于乳突和其正对面的一端。两端都有芽管萌发时，一端的芽管侵入虫体后，另一端则不再入侵，这可能是由于一端入侵更有利于集中力量打破虫体屏障。虫霉的次生分生孢子一般在没有遇到适当寄主时才由初生分生孢子萌发生成，这是延续侵染性的一种方法（冯明光和徐均焕，2002），附着于虫体表面的努利虫疠霉的初生分生孢子极少萌发生成次生孢子，说明桃蚜是适合该菌感染的蚜虫寄主。

被努利虫疠霉感染的桃蚜体表上假囊状体不多见（Gustafsson，1965；李增智，2000），我们仅在虫体的两侧观察到有假囊状体的存在。Butt 等（1990）认为，一些虫霉目真菌在寄主死亡后从寄主体内长出的假囊状体发挥着协助真菌捕获水分的功能。我们在研究湿度对努利虫疠霉产孢影响时发现，该菌对相对湿度的要求较高，仅在水琼脂培养平板上才能保证虫尸完全产孢（Li *et al*.，2006）。努利虫疠霉的假根突破虫体的位置与新蚜虫疠霉存在极大的差别，前者位于蚜虫的胸部第 1 对足与第 2 对足之间，后者位于腹部中间（Butt *et al*.，1990）。假根位置的不同直接导致了感染此两种虫霉的蚜虫尸体在叶片附着时的差异表现。感染努利虫疠霉的早期死亡蚜虫尸体腹部明显上举，并且在胸部背面中间位置有一个明显的褐色点；感染新蚜虫疠霉的蚜尸则被从腹部长出的假根紧紧地固定在基物上，整个蚜尸呈平铺状。

尽管目前仍不清楚控制假根和囊状体分化的机制（Butt *et al*.，1990），但这两种结构存在着某种联系（Gustafsson，1965），甚至有的学者认为在某种意义上假囊状体其实就是假根（Brobyn and Wilding，1977），这仍有待进一步研究。

参考文献（References）

Brobyn PJ，Wilding BN，1977. Invasive and developmental processes of *Entomophthora* species infecting aphids. *Trans. Br. Mycol. Soc.*，69：349－366.

Butt TM，Beckett A，Wilding N，1990. A histological study of the invasive and developmental processes of the aphid pathogen *Erynia neoaphidis*（Zygomycotina：Entomophthorales）in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Can. J. Bot.*，68：2 153－2 163.

Eilenberg J，Bresciai J，Latge JP，1986. Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora*. *J. Invertebr. Pathol.*，48：318－324.

Feng MG，Xu JH，2002. Attachment and invasion of *Pandora delphacis* conidia into the integument of the green peach aphid，*Myzus persicae*. *Mycosystema*，21(2)：270－273. [冯明光，徐均焕，2002. 飞虱虫疠霉分生孢子在蚜虫体壁上的附着与入侵. 菌物系统，21(2)：270－273]

Gustafsson M，1965. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden Ⅰ. Classification and distribution. *Lantbrukshogskolans Annaler*，31：103－212.

Li W，Xu WA，Sheng CF，Wang HT，Xuan WJ，2006. Factors affecting sporulation and germination of *Pandora nouryi*（Entomophthorales：Entomophthoraecae），a pathogen infecting *Myzus persicae*（Homoptera：Aphididae）. *Bio. Sci. Technol.*，16(5/6)：647－652.

Li XY，Yang Y，Xu WA，Li ZH，2003. Bioassay of virulence of *Pandora nouryi* to green peach aphid，*Myzus persicae*. *Pesticides*，42(7)：20－22. [李雪雁，杨勇，许维岸，李照会，2003. 诺氏虫疠霉对桃蚜的毒力. 农药，42(7)：20－22]

Li ZZ，2000. Flora Fungorum Sinicorum. Vol. 13. Entomophthorales. Beijing：Science Press. 100－101. [李增智，2000. 中国真菌志. 第 13 卷. 虫霉目. 北京：科学出版社. 100－101]

Papierok B，Hajek AE，1997. Fungi：entomophthorales. In：Lacey LA ed. Manual of Techniques in Insect Pathology. London，UK：Academic Press. 187－212.

Wang WM，Zhao J，Lu WH，1988. A pathogenic fungus of aphids，*Erynia nouryi*. In：Group of Mycology，Botanical Society of China ed. Study and Application of Entomogenous Fungi in China. Vol. 1. Beijing：Academic Journal Press. 153－155. [王未名，赵谨，陆文华，1988. 蚜虫寄生真菌——诺氏虫疫霉. 见：中国植物学会真菌学专业组编. 中国虫生真菌研究与应用. 第 1 卷. 北京：学术期刊出版社. 153－155]

（责任编辑：黄玲巧）

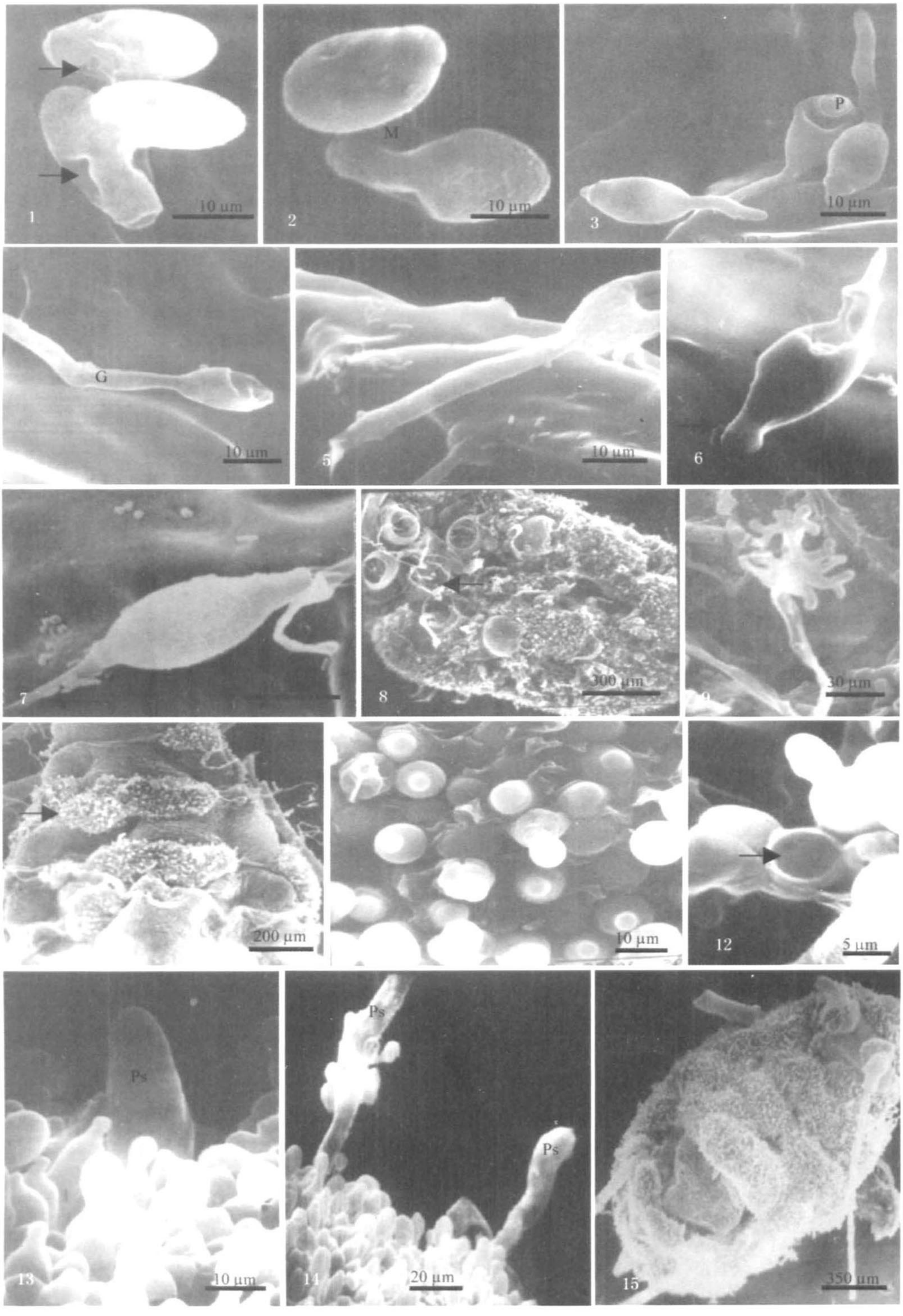
图版Ⅰ说明 Explanation of plate Ⅰ

1：即将萌发的初生分生孢子，箭头示乳突两侧的凹陷 Germinating primary conidia on the surface of *Myzus persicae*, arrows show invagination on the sides of papillum；2：萌发的初生分生孢子 Germinating primary conidia；3：从乳突正对面一端萌发的孢子 Germ tube growing from the opposite end of papillum；4：初生分生孢子萌发长出的芽管在桃蚜体壁生长延伸 Germ tube growing along the host surface；5：芽管寻找适合入侵的部位 Germ tube seeking the appropriate region for invasion；6：靠近孢子本体生长出的球形附着胞（箭头所示）Globose appressorium closed the body of a primary conidium；7：两端萌发的初生分生孢子，箭头示其中一端侵入桃蚜体壁 Germ tubes growing from the two sides of a primary conidium；8：从胸部的腹面长出体外的假根（箭头所示）Rhizoids emerging from the breast region of *M*. *persicae*；9：掌状分枝的假根 Rhizoid showing the palmated holdfast；10：从胸部背面长出虫体的分生孢子梗（箭头所示）Conidiophores emerging from the breast region of *M*. *persicae*；11：突破虫体的分生孢子梗 Conidiophores breached the integument of *M*. *persicae*；12：弹射孢子后，孢子梗呈现的凹陷口 A hole in conidiophore after discharging a conidium；13：刚突出虫体表面的分生孢子梗和假囊状体 Conidiophores and immature pseudocystidia；14：发育成熟的假囊状体 Mature pseudocystidia；15：感菌 72 h 后的蚜虫体表 Appearance of *M*. *persicae* infected by *Pandora nouryi* after 72 h.

M：粘性外壁 Adhesive mucus；P：乳突 Papilla；G：芽管 Germ tube；Ps：假囊状体 Pseudocystidia.

李伟等：努利虫疠霉感染桃蚜过程的扫描电镜观察 **图版 Ⅰ**

LI Wei *et al*. ：Invasive processes of *Pandora nouryi*（Remaudière & Hennebert）Humber in green peach aphid *Myzus persicae*（Sulzer）observed with scanning electronic microscopy Plate Ⅰ



图版说明见文后 Explanation at the end of the text